

平成 28-30 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの  
強化に関する研究」

分担研究報告書

カンピロバクター・レファレンス

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本章治	国立感染症研究所
研究協力者	今野貴之	秋田県健康環境センター
研究協力者	赤瀬悟	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山田和弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	坂田淳子	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	尾羽根紀子	山口県環境保健センター
研究協力者	原田誠也	熊本県保健環境科学研究所
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所

**研究要旨：**カンピロバクターによる感染症の発生動向の探知に資するため、6 レファレンスセンターの協力を得て、1) 散发事例由来株を主な対象に薬剤耐性プロファイル及び Penner 血清型別を調査した。2) また、Penner-PCR 法による型別試験を行い、Penner 血清型別との整合性について検討を行った。3) 検査法についてアンケート調査を行い、全国統一的な検査方法を進めるための課題について考察した。1) については、平成 29 年度～30 年度にかけて収集された *C. jejuni* 計 292 株について薬剤感受性試験を実施したところ、各薬剤に対する耐性率は、シプロフロキサシンが 49% (N=142)、テトラサイクリンが 32% (N=94)、エリスロマイシンが 2% (N=7) であった。Penner 血清型別試験では、70.5% (129/183) の菌株が型別不能となり、型別可能株では D 群が最も多かった。2) については、Penner 血清型別法による低い型別率の向上に資するため、同形質を遺伝学的に型別する Penner-PCR 法により Penner 血清型別不能株を対象に実施したところ、120 株中 113 株 (94.1%) が型別された。また、Penner 血清型別可能であった 142 株については 136 株 (95.8%) が一致した型に分類され、高い同等性が示された。今後 Penner-PCR 法における陽性対照を確保し同法の普及を進めた上で、国際動向を踏まえた型別法の平準化が必要となるものと思われる。3) については、レファレンスセンターを通じて全国の試験検査機関にカンピロバクター検査法に関するアンケート調査を実施し、今後平準化すべき課題の抽出を行うことができた。

**A. 研究目的**

主として食品が媒介する細菌性感染症のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリによるものは最も高頻度に発生している。本分担研究では、6 レファレンスセンターの協力の下、主として感染症病原体監視並びに健康危機対

応の観点から、カンピロバクター感染症の発生動向、並びに原因物質の危害性とその検査法に関する問題点と改善措置について検討を行うことを目的として、検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 活動体制

本分担研究では、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所を含む、全国 6 地方衛生研究所により構成されるカンピロバクター・レファレンスセンターの活動成績をまとめ、報告することとした。

### 2. 薬剤感受性試験及び Penner 血清型別

#### 1) 薬剤感受性試験

カンピロバクター・ジェジュニ散発事例由来株を対象として、平成 29 年度には、これまでのレファレンスセンター活動において実施されてきた方法に基づき、試験を実施した。平成 30 年度には、EU-CAST 法に準拠したディスク拡散法を用いて統一的な試験方法とした。その概要は以下のとおりである。

#### 試薬及び器具・器材等

- ①薬剤感受性用寒天平板：5%馬脱繊維血及び 20 mg/mL  $\beta$ -NAD 加 MH-F 寒天培地
- ②菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ③薬剤ディスク：BD センシディスク エリスロマイシン (EM)，テトラサイクリン (TC)，シプロフロキサシン (CPFX)
- ④白金線，白金耳
- ⑤滅菌済綿棒
- ⑥滅菌済ピンセット
- ⑦ふ卵器：通常のみ卵器の場合は、市販の微好気用ガスパック等を利用する。微好気環境を維持できるふ卵器も使用可能とする。

#### 操作上の注意について

- ①菌株：前日に供試菌株を非選択分離培地に分離培養し、1 種類の菌であることを確認した上で使用する。
- ②試薬は室温に戻してから使用すること。
- ③MH-F 平板は、接種菌の滑走を抑制するため、十分に乾燥させてから使用すること。20-25℃で一夜自然乾燥、または 35℃で蓋を開けた状

態で 15 分乾燥を目安とする。

#### 試薬等の調整方法

- ①  $\beta$ -NAD：滅菌蒸留水を用いて終濃度 20mg/mL に調整し、0.2 $\mu$ m 径フィルターを用いて濾過滅菌したものをストック溶液とする。長期保存は、-20℃で凍結するが、再凍結を繰り返さないこと。
- ②MH-F 平板：MH 寒天培地を指示書に従い、計量後、蒸留水に溶解し、オートクレーブ滅菌する。約 42~45℃に冷却後、培地 1L に対し 50mL の馬脱繊維血と 1mL の  $\beta$ -NAD ストック溶液（上述）を加え、速やかに混和させる。シャーレに厚さ 4 $\pm$ 0.5 mm となるよう（90 mm 径の場合には約 25mL）、混合培地溶液を平らな場所で無菌的に注ぎ入れ、静置して固化させる。保存する場合には、冷蔵保存して差し支えない。なお、保存期間は各所が定める規則に準じること。

#### 測定（操作）方法

- ①接種菌液の調整：MH 寒天平板に分離した菌株（37 $\pm$ 1℃・24~48 時間または 42℃・24 時間培養）を滅菌生理食塩水または MH ブロスに懸濁し、McFarland 0.5 に調整する。
- ② 接種・培養  
調整菌液に滅菌綿棒を浸し、余液を試験管壁で取り除く。ただし、本菌は乾燥に弱いので、固く絞り過ぎないこと。
- ③MH-F 平板に塗抹する。平板を約 60° ずつ回転させた位置から、3 回塗抹する。綿棒に菌液をつけるのは最初に行った 1 回でよい。
- ④滅菌ピンセットを用いてディスクを置く。寒天培地に密着させるため、ピンセットでディスクを適度に押さえる。42℃（24 時間）で微好気培養する。  
注意：上記の操作は、出来るだけ迅速に行う。特に、菌を塗抹した寒天平板培地を長時間大気中に置かないようにし、15 分以内を目安とする。

## 判定

培養後、シャーレの蓋を取って、約 30 cm離れた位置から目視観察し、ディスク周囲に形成された阻止円直径を測定・記録する。耐性・感受性の判定基準は以下のとおりである。

薬剤	EUCAST	
	耐性 (R) ( $<$ mm)	感受性 (S) ( $\geq$ mm)
EM	<i>C. jejuni</i> 20, <i>C. coli</i> 24	
CPFV	26	
TC	30	

## 2) Penner 血清型別

上記の分離株を対象として、カンピロバクターLA「生研」及びカンピロバクター免疫血清を指示書に従って用い、Penner 血清型別を行った。

## 3. Penner-PCR 法

Poly らの報告 (PLoS One. 2015; 10(12): e0144349.) に従い、多糖莢膜 (CPS) 遺伝子領域を標的とするマルチプレックス PCR 法により、平成 29 年度には血清型別判定不能株を、平成 30 年度には血清型別判定可能株をそれぞれ対象として、PCR 型別法の成績を評価した。なお、同法の陽性対照 DNA については全てを調整可能な状況にはないため、限定的な配布とした。

## 4. アンケート調査

各レファレンスセンターを通じ、各ブロックの試験検査機関を対象に検査法に関するアンケート調査への協力を求め、その結果を取り纏めた。

## C. 結果

## 1. *C. jejuni* 株の薬剤感受性に関する動向

平成 29~30 年度に検出された *C. jejuni* 計 292 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、シプロフロキサシン耐性は 142 株 (48.6%)、テトラサイクリン耐性は 94 株 (32.2%) と高い頻度で認められた (表 1)。エリスロマイシン耐性は 7 株 (2.4%) であった (表 1)。また、ナリジクス酸については平成 29 年度に収集された計 170 株のみを対象としたが、うち 69 株 (40.6%) と同様に高い耐性率を認めた (表 1)。

なお、*C. coli* 株については 10 株のみが対象として確保され、薬剤感受性についてはエリスロマイシン耐性が 4 株 (40%)、テトラサイクリン耐性またはシプロフロキサシン耐性がそれぞれ 5 株 (50%) 認められた。

## 2. Penner 血清型別

平成 29 年度に収集された *C. jejuni* 計 183 株について Penner 血清型別試験を行ったところ、型別不能株は 129 株と約 70.5%を占めた (表 2)。型別された菌株の内訳としては、D 群が 15 株 (8.2%) と最も多く、A 群 (5 株、2.7%)、B 群・C 群・J 群 (各 4 株、2.2%) がこれに続いた (表 2)。

平成 30 年度には Penner 血清型別が可能となった計 142 株のみの構成について報告を求めた。全体の傾向としては、前年度と同じく D 群が最も高い占有率を示し、30 株 (21.1%) であった (表 2)。また、これに続く型としては O 群 (22 株、15.5%)、C 群 (14 株、9.9%)、B 群 (13 株、9.2%)、F 群 (12 株、8.5%) があげられた (表 2)。

## 3. Penner-PCR 法による遺伝子型別

平成 29 年度に実施した Penner 血清型別試験において型別不能と判定された 120 株について、Penner-PCR 法による遺伝子型別を行ったところ、113 株 (94.1%) については型別化

が可能であった（表 3）。平成 30 年度には、Penner 血清型別が可能であった計 142 株を対象に同遺伝子型別法を実施し、結果の同等性を評価したところ、136 株が同一の型別結果を示し、一致率は 95.8%であった（表 3）。二法間で不一致となった菌株の血清型は、A 群、D 群、F 群、I 群であった（表 3）。

#### 4. 検査法に関するアンケート調査

臨床検査については、項目の別に最大で 50 機関から有効回答が得られた。年間検体数について、100 検体以上の検査実績があるとした機関は 0～100 検体とする機関と同数であり、多検体を処理する機関が多い状況が示された。検体からのカンピロバクター検出にあたっては、増菌培養を行うとする機関が全体の 80%を占め、このうち 93%の機関ではプレストンが増菌培地として用いられていた。その後の選択分離培地については、mCCDA、CCDA(SEL)等が 6 割を占めたが、バツラーまたはスキロー培地を使用する施設も 2 割存在した。このほか、分離株の保存については、スキムミルクを使用する機関が最も多く（約 42%、18/43）、グリセロールを使用する機関が約 35%（15/43）、マイクロバンクを使用する機関が約 23%（10/43）との回答が得られた。

食品検査については、項目の別に最大 47 機関から有効回答が得られた。年間検体数について、100 検体以上の検査実績があるとした機関は 46 機関中 18 機関（約 39%）であり、残り 28 機関（約 61%）では 0～100 検体の検査実績であった。受入時の検体の状態としては冷蔵が多いとする機関が 45 機関中 36 機関であった。増菌培養にあたっては、プレストン培地を用いるとする機関が臨床検査と同様に最も多く（約 81%、39/48）、他の培地を用いる機関の割合は相対的に少ない状況にあった。一方で、増菌培養を実施しないとする機関も含まれた

（2 機関）。食品等からの対象菌検出にあたっての迅速簡便法の利用実績については、6 機関から回答が得られ、リアルタイム PCR 法、PCR 法、イムノクロマト法、miniVIDAS の利用が挙げられた。

#### D. 考察

*C. jejuni* の薬剤感受性については、これまでと同様にフルオロキノロン耐性率が高い状況にあること、テトラサイクリン耐性率は徐々に上昇傾向にあることが明らかとなった。国際的に AMR 対策が求められる状況の中、本病原体の成績に関する収集・報告体制を維持管理する意味において、本研究班の役割は今後も継続発展的に大きなものと位置付けられよう。また、*C. coli* については、試験方法のバイアスを受けて、確保され難い状況となっているとも予想されるため、調査対象とする上では試験段階でのスクリーニングの導入も一手と目される。

同様に、薬剤感受性試験法についても統一化が今後求められる課題といえる。これに関連して、平成 30 年度にはディスク拡散法の判定基準として阻止円直径が明示される EU-CAST 法を試行的に採用し、その評価と課題等について意見を求めた。同法の利点は判定基準の明確性が複数のセンターから意見として挙げられた一方、欠点としては  $\beta$ -NAD の添加が労力・費用面から挙げられた。

血清型別の動向としては、型別不能株がおおよそ 7 割を占め、同法の改善が現行の体制を大きく変えないという前提の下では急務の課題であった。遺伝子検査法については血清型別成績と高い一致率を認めたことから、同法は選択肢の一つとなる可能性が示唆されたと考えられる。一方で、カンピロバクター菌株の分類には詳細な型別化が有効とされ、そもそも血清型別は *C. jejuni*/*C. coli* の同一性判定やモニタリング・サーベイランスには適さないとする国際的

認識についても踏まえる必要がある。また、Penner 血清型及び同 PCR 法における標的分子（遺伝子）は菌体表層のギランバレー症候群やミラーフィッシャー症候群の誘発分子と目される多糖構造体（LOS）であり、LOS 型別法は別途開発評価されている状況にある。従って、LOS 型別法と Penner 血清型・遺伝子型別型との互換性を今後検討することは、前者の使用目的用途を明確化する上で有益な知見が得られると期待される。

検査法に関するアンケート調査においては、臨床・食品検体の別を問わず、Preston-mCCDA を用いた増菌培養が最も多く採用されており、この傾向は国際動向に合致したものと見える。過去には、スキロー培地やボルトン培地が好まれて用いられた時期もあったが、現在、培地は夾雑菌や対象菌の多少により選択すべきものと整理されている。この点では、対象菌が少ないことの多い食品検体からの検出効率の向上が求められる。実際に国際標準化機構

（ISO）では対象食品の性質（対象菌と夾雑菌の多少、または食品マトリックスが鶏肉か否か）により 3 種の方法を選択できるよう、2017 年に改訂が行われ、EU では鶏肉のカンピロバクターに対して同法を用いた規格基準値が設定され、2018 年 1 月より運用されている。原因食品が殆ど特定されていないわが国におけるカンピロバクター食中毒の発生動向を踏まえると、今後適切な検査方法について国内においても検証をふまえた改訂を検討する必要があると思われる。また、本年度に入り、複数の迅速簡易法が ISO 法等との同等性が国際的な第三者認証機関（AFNOR、AOAC 等）により確認され、国内にも上市されつつある。こうした手法の有効利用についても評価を行い、その結果を検査機関に還元することも有用と思われる。

## E. 結論

*C. jejuni* はシプロフロキサシン、ナリジクス酸、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高く、これらの動向を引き続きモニタリングする必要がある。分離菌株の型別・分類法として、以前より国内で汎用される Penner 血清型別法の型別率低下は顕著であり、Penner-PCR 法によりこれらの多くを補える可能性が示唆された。一方で国際的には血清型別法そのものが低い識別能であるため、モニタリングやサーベイランスへの適用は望ましくないとする考え方が主流となっており、今後、国内での分離株の特性を探知するための手法については慎重に検討を進める必要がある。

検査法に関するアンケート調査を通じ、今後平準化を図るべき項目について抽出を行うことができた。これらの課題解決に向けて、レファレンス活動の更なる連携が求められよう。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 平成 29～30 年度の *C. jejuni* 分離株における薬剤耐性状況

薬剤	平成29年度		平成30年度		平成29～30年度	
	耐性株数	耐性率%	耐性株数	耐性率%	耐性株数	耐性率%
シプロフロキサシン	73	42.9	69	56.6	142	48.6
テトラサイクリン	57	33.5	37	30.3	94	32.2
ナリジクス酸	69	40.6	NT	-	69	-
エリスロマイシン	2	1.2	5	4.1	7	2.4
感受性	80	47.1	48	39.3	128	43.8
供試株数	170	-	122	-	292	-

表 2. 平成 29～30 年度の *C. jejuni* 分離株における Penner 血清型別

血清型	平成29年度	平成30年度
A 群	5	7
B 群	4	13
C 群	4	14
D 群	15	30
E 群	0	1
F 群	3	12
G 群	1	5
I 群	1	4
J 群	4	2
K 群	2	6
L 群	3	4
N 群	0	4
O 群	1	22
P 群	2	2
R 群	2	6
S 群	0	0
U 群	0	1
V 群	0	0
Y 群	4	7
Z 群	3	0
Z 2 群	0	0
Z 4 群	0	0
Z 5 群	0	0
Z 6 群	0	2
Z 7 群	0	0
型別不能	129	-
計	183	142

\*平成 30 年度は、型別不能株数は計上せず。

表 3. Penner-PCR 法の Penner 血清型別との一致性

血清型	菌株数	Penner-PCR法*		
		一致株数	不一致株数	一致率 (%)
A群	7	6	1	85.7
B群	13	13	0	100
C群	14	14	0	100
D群	30	28	2	93.3
E群	1	1	0	100
F群	12	11	1	91.7
G群	5	5	0	100
I群	4	2	2	50
J群	2	2	0	100
K群	6	6	0	100
L群	4	4	0	100
N群	4	4	0	100
O群	22	22	0	100
P群	2	2	0	100
R群	6	6	0	100
S群	0	0	0	-
U群	1	1	0	100
V群	0	0	0	-
Y群	7	7	0	100
Z群	0	0	0	-
Z 2 群	0	0	0	-
Z 4 群	0	0	0	-
Z 5 群	0	0	0	-
Z 6 群	2	2	0	100
Z 7 群	0	0	0	-
計	142	136	6	95.8

図 1.血清型別不能株に対する Penner-PCR 法の型別判定性評価

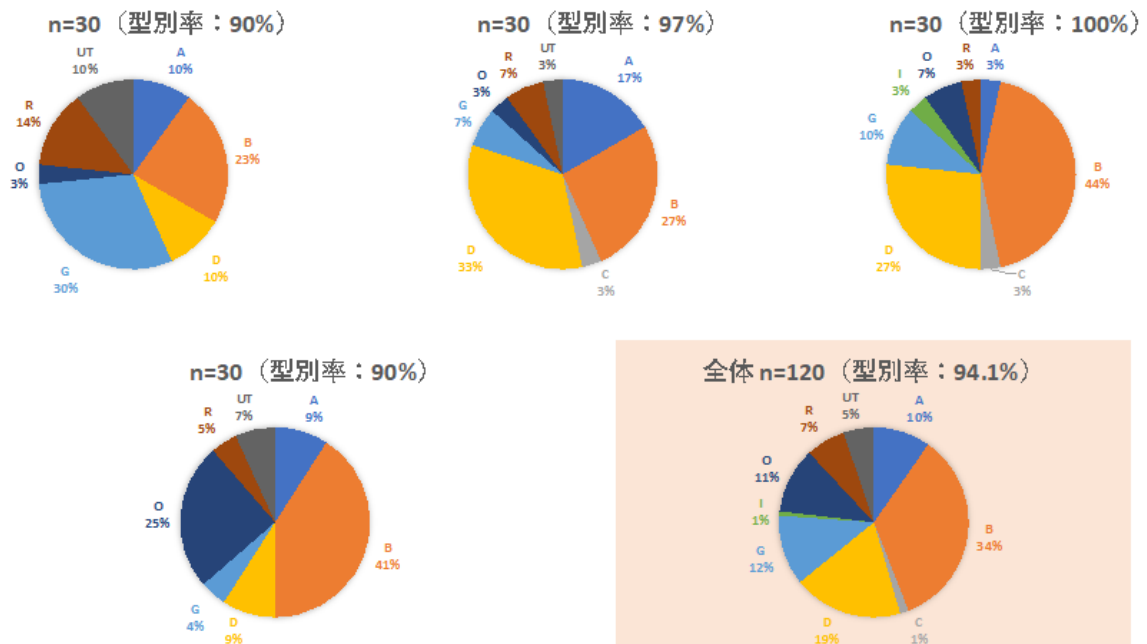
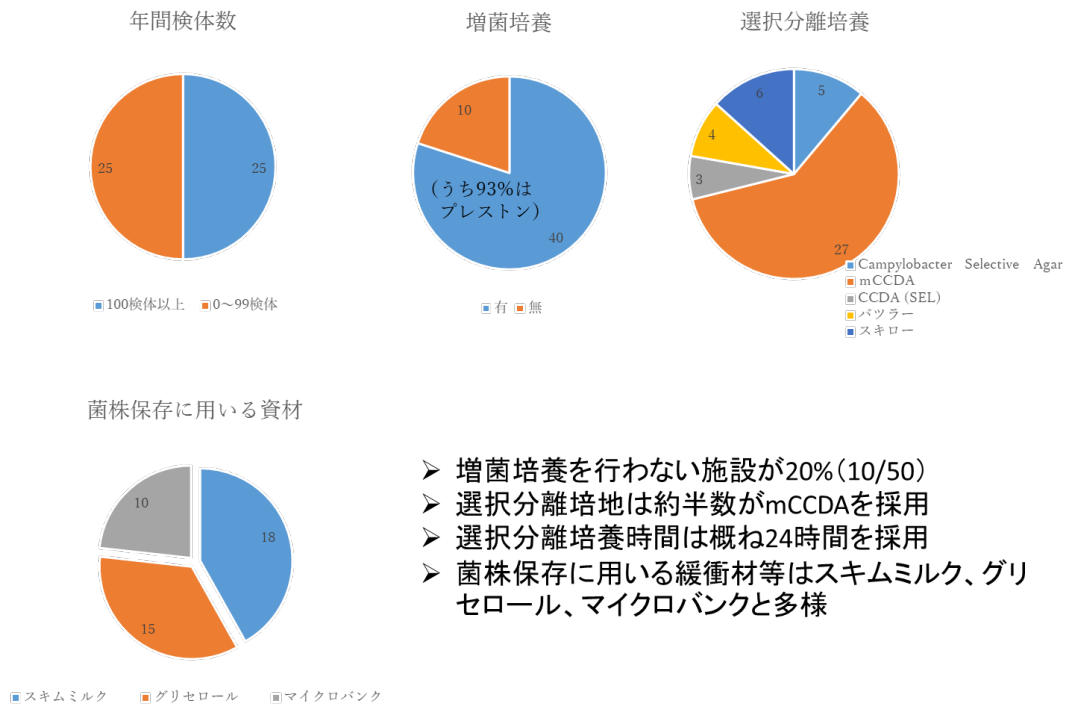


図 2. 検査法に関するアンケート調査 (臨床検体)



- 増菌培養を行わない施設が20% (10/50)
- 選択分離培地は約半数がmCCDAを採用
- 選択分離培養時間は概ね24時間を採用
- 菌株保存に用いる緩衝材等はスキムミルク、グリセロール、マイクロバンクと多様



図 3. 検査法に関するアンケート調査（食品検体）

